ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 32, 5, 1998

УДК 595.729; 593.195; 593.192.1; 577.158

ВЛИЯНИЕ МИКРОСПОРИДИИ NOSEMA GRYLLI И КОКЦИДИИ ADELINA GRYLLI НА АКТИВНОСТЬ ЧЕТЫРЕХ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ЖИРОВОМ ТЕЛЕ СВЕРЧКОВ GRYLLUS BIMACULATUS

© В. В. Долгих

В жировом теле самок сверчков *Gryllus bimaculatus* спектрофотометрическим методом изучено изменение удельных активностей гексокиназы (КФ 2.7.1.1), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.8), пируваткиназы (КФ 2.7.1.40) и алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) при заражении микроспоридией *Nosema grylli* и кокцидией *Adelina grylli*. В результате исследования не выявлено достоверного изменения активности гексокиназы при обоих типах заражения по сравнению с контролем. Активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы увеличивается приблизительно в 6 раз при микроспоридиозе и в 4 — при кокцидиозе. Активность пируваткиназы при микроспоридиозе увеличивается более чем в 10 раз, а при заражении *A. grylli* не отличается от контроля. Активность алкогольдегидрогеназы, напротив, возрастает в 2—3 раза при кокцидиозе и не отличается от контроля при заражении микроспоридиями. Проводится обсуждение данных о влиянии микроспоридий и кокцидий на активность ферментов клетки хозяина в связи с физиологическими особенностями паразитов.

Двупятнистые сверчки *Gryllus bimaculatus*, в жировом теле которых развиваются микроспоридия *Nosema grylli* (Соколова и др., 1994) и кокцидия *Adelina grylli* (Бутаева, 1996), являются удобным объектом для изучения различных аспектов внутриклеточного паразитизма. Использование этой модели позволяет сравнить влияние паразитов из разных типов подцарства Protozoa на клетку одной и той же ткани хозяина. Наш интерес к этому вопросу обусловлен отличиями в энергетическом обмене паразитов.

Метаболические особенности микроспоридий остаются до настоящего времени малоизученными. Отсутствие митохондрий у этих древних паразитов позволяет предположить, что микроспоридии используют анаэробные процессы гликолиза для синтеза АТФ. В пользу этого свидетельствуют данные о выявлении активности фосфоглюкоизомеразы и фосфоглюкомутазы в спорах микроспоридии *Nosema heterosporum*, а также фосфоглюкомутазы в спорах *Vairimorpha necatrix* после электрофореза белков спор в крахмальном геле (Hazard e. a., 1981). Кроме того, активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, фосфоглюкомутазы, глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и пяти гликолитических ферментов были обнаружены нами в гомогенате очищенных спор микроспоридии *Nosema grylli* (Dolgikh e. a., 1997). Были получены также данные, позволившие предположить выделение паразитами в клетку хозяина пирувата и глицерол-3-фосфата в качестве конечных продуктов обмена.

У представителей типа Apicomplexa были обнаружены ферменты гликолиза, цикла Кребса, лактатдегидрогеназа и глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (Хованских, 1984). Эти данные и наличие митохондрий у споровиков позволяют предположить, что кокцидии способны использовать аэробные процессы для обеспечения энергией. При анаэробном обмене главную роль, вероятно, играет образование молочной кислоты при помощи лактатдегидрогеназы, как это имеет место у возбудителей малярии (Sherman, 1979).

Мы предполагаем, что состав и количество соединений, поглощаемых и выделяемых в клетку хозяина, отличаются у микроспоридии *N. grylli* и кокцидии *A. grylli*. В связи с этим представляет интерес сравнить влияние двух паразитов на активность ферментов энергетического и углеводного обмена зараженной клетки. Эти данные могут быть полезными как для дальнейшего изучения энергетики паразитов, так и для выяснения особенностей интеграции партнеров в единую метаболическую систему.

Ранее нами было проведено сравнение влияния двух паразитов на активность лактатдегидрогеназы (Долгих и др., 1995), НАД-зависимой малатдегидрогеназы, малик-энзима и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Долгих и др., 1996) в жировом теле сверчков. В настоящей работе представлены данные об изменении удельных активностей гексокиназы (КФ 2.7.1.1), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.8), пируваткиназы (КФ 2.7.1.40) и алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) в жировом теле самок сверчков *G. bimaculatus* при заражении микроспоридией *N. grylli* и кокцидией *A. grylli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили сверчки *Gryllus bimaculatus* из лабораторных популяций, поддерживаемых в инсектарии ИЭФиБ им. И. М. Сеченова РАН. Насекомых содержали в условиях, сходных с описанными для инсектария ИЭФиБ (Князев, 1985). Для искусственного заражения использовали сверчков, полученных из отмытых в воде яиц, отложенных незараженными самками. Личинок второго и третьего возрастов заражали микроспоридиями, добавляя на вату поилки водную суспензию зрелых спор из расчета приблизительно 10^6—10^8 спор в 1 мл. Через 1—2 недели ватную пробку заменяли чистой. Заражение сверчков кокцидиями *Adelina grylli* осуществляли на той же стадии развития личинок. Гомогенат жирового тела, содержащего зрелые ооцисты паразитов, наносили на вату поилки или в садок вносили мертвых зараженных кокцидиями особей после суточного голодания личинок. Наряду с искусственным заражением в работе были использованы сверчки, полученные из культур, естественно зараженных паразитами. Интенсивность инвазии оценивали микроскопированием препаратов жирового тела.

Для изучения активности ферментов использовались только самки сверчков более 3 дней после линьки на имаго. Отпрепарированное жировое тело промывали в 10 мМ трис-HCl (pH 7.8), 150 мМ NaCl и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком при добавлении 100 мМ трис-HCl буфера (pH 7.8), содержащего 0.3 М сахарозу, 25 мМ KCl, 0.5 мМ PMSF, 0.5 мМ ДТТ. Гомогенат центрифугировали при 200 g 10 мин для удаления стадий развития паразитов. Супернатант центрифугировали при 6000 g 30 мин и надосадочную жидкость использовали для определения активности ферментов. Все операции проводили при +4°.

Активность ферментов определяли спектрофотометрическим методом в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при длине волны 340 нм и температуре +37°. Реакционная смесь для определения активности гексокиназы: 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ глюкоза, 1 мм АТФ, 0.5 мМ НАДФ, 0.5 Е/мл активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, проба. Контроль не содержал глюкозы или АТФ. Смесь для глицерол-3-фосфатдегидрогеназы: 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 1 мм глицерол-3-фосфат, 1 мМ НАД, проба. Контроль не содержал α-глицерофосфата или НАД. Смесь для пируваткиназы: 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 100 мМ KCl , 5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ фосфо(енол)пируват, 1 мМ АДФ, 0.125 мМ НАДН, 0.5 Е/мл активности лактатдегидрогеназы, проба. Контроль не содержал пробы или фосфоенолпирувата или АДФ. Смесь для алкоголь-

Удельная активность ферментов в жировом теле сверчков и стадиях развития микроспоридий нмоль/мин · мг белка

Specific activity of enzymes in fat body of crickets and at stages of microsporidian life cycle (nmole/min · mg protein)

Варианты	ГексоК	Глицерол-3-ФДГ	ПируватК	АДГ
		Жировое тело		
Контроль	71 ±8 (20)	4 ±1 (19)	14 ±3 (18)	12 ±1 (16)
Микроспоридиоз	71 ±8 (19)	24 ±3 (19)	162 ±13 (23)	13 ±1 (13)
Кокцидиоз	85 ±9 (13)	17 ±4 (12)	20 ±4 (20)	33 ±6 (13)
		Микроспоридии		
Споры	<0.2 (8)	16 ±2 (7)	6 ±1 (6)	<0.2 (4)
Доспоровые стадии	Нет данных	15 ±3 (2)	5 ±2 (2)	Нет данных

Примечание. В скобках — количество независимо исследованных особей или проведенных процедур очистки спор и стадий; P < 0.2 — активность ниже границы чувствительности метода.

дегидрогеназы: 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 2.8 % этанола, 0.5 мМ НАД, проба. Контроль не содержал НАД.

Электрофорез белков для дальнейшего окрашивания на глицерол-3-фосфатдегидрогеназу проводили в 7.5%-ном ПААГ [гелевый буфер: 0.38M трис-HCl (pH 8.9), электродный буфер: 5 мМ трис, 38 мМ глицин, HCl (pH 8.3)]. Гели окрашивали на глицерол-3-фосфатдегидрогеназу по методике Грелля (Корочкин и др., 1977).

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976).

В таблице представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между выборками определяли при помощи критерия Стьюдента ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование показало, что в жировом теле незараженных самок наблюдается относительно высокая активность гексокиназы (см. таблицу). При этом как микроспоридии, так и кокцидии не оказывают достоверного влияния на удельную активность фермента.

В жировом теле контрольных самок наблюдается низкая активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, а у некоторых особей активность была ниже чувствительности использованной методики тестирования. При этом как микроспоридиоз, так и кокцидиоз вызывают увеличение удельной активности фермента. При заражении *N. grylli* активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы увеличивается приблизительно в 6 раз, а при заражении *A. grylli* — в 4 раза. Следует отметить, что фермент инактивируется при хранении более суток при +4°. При электрофорезе растворимых белков зараженного жирового тела и очищенных спор микроспоридий в ПААГ с последующим окрашиванием на глицерол-3-фосфатдегидрогеназу фермент спор и зараженного жирового тела имел различную электрофоретическую подвижность (рис. 1).

Активность пируваткиназы при микроспоридиозе увеличивается более чем в 10 раз. Из всех изученных ферментов активность пируваткиназы увеличивается при заражении в наибольшей степени. Вместе с тем при заражении сверчков кокцидиями мы не обнаружили достоверного изменения активности пируваткиназы по сравнению с контролем.

При изменении удельной активности алкогольдегидрогеназы, напротив, мы не обнаружили достоверного изменения активности фермента при микроспоридиозе.

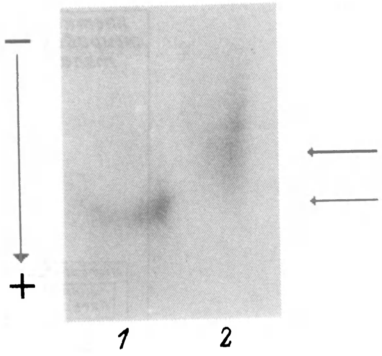

Рис. 1. Сравнение электрофоретической подвижности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы спор микроспоридий и зараженного жирового тела.

1 — зараженное микроспоридиями жировоое тело; *2* — очищенные споры микроспоридий.

Fig. 1. Comparison of glycerol 3-phosphate dehydrogenase mobility of infected with *N. grylli* fat body and purified spores in PAAG.

В то же время кокцидии вызывают повышение активности алкогольдегидрогеназы по сравнению с контролем в 2—3 раза. Увеличение активности наблюдается и в случае совместной инвазии, что, вероятно, обусловлено влиянием кокцидий.

В очищенных спорах микроспоридий активность гексокиназы и алкогольдегидрогеназы находилась ниже границы чувствительности метода, которая составляет приблизительно 0.2 нмоль/мин · мг белка. Активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы в спорах и выделенных по методу Селезнева (Selesnev e. a., 1995) внутриклеточных стадиях развития микроспоридий была несколько ниже, чем в зараженном жировом теле, а активность пируваткиназы в тех же пробах не превышала 5 % от наблюдаемой в зараженной ткани хозяина.

ОБСУЖДЕНИЕ

Значительное увеличение удельной активности пируваткиназы и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы в жировом теле сверчков при микроспоридиозе не связано с присутствием в пробах высокоактивных ферментов частично разрушенных стадий микроспоридий, так как активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и пируваткиназы паразитов ниже, чем активность, наблюдаемая в зараженном жировом теле. Кроме того, использованный метод гомогенизации жирового тела тефлоновым пестиком не приводит к разрушению внутриклеточных стадий, так как позволяет проводить их выделение и очистку от гомогената (Seleznev e. a., 1995). В пользу отсутствия в пробах ферментов паразитов свидетельствует и различная электрофоретическая подвижность в ПААГ глицерол-3-фосфатдегидрогеназы спор и зараженного жирового тела (рис. 1).

Усиление активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и пируваткиназы может быть связано с общим усилением энергетического обмена в зараженной клетке. Ранее мы обнаружили, что микроспоридии вызывают 5-кратное увеличение активности лактатдегидрогеназы как по прямой, так и по обратной реакциям (Долгих и др., 1995). С другой стороны, увеличение активности ряда ферментов в жировом теле может быть связано с утилизацией клеткой хозяина конечных продуктов энергетического обмена паразитов (рис. 2). Отсутствие влияния микроспоридий на активность алкогольдегидрогеназы, возможно, связано с тем, что для микроспоридий не характерно спиртовое брожение и выделение этанола как конечного продукта.

Различия во влиянии двух паразитов на организм хозяина, вероятно, объясняются физиологическими отличиями микроспоридий и кокцидий. Для дальнейшего изучения вопросов интеграции обменных процессов микроспоридий, кокцидий и клетки хозяина необходимы данные о метаболизме кокцидии *A. grylli* и выяснение биохимических особенностей внутриклеточных стадий микроспоридий, которые в отличие от спор остаются неизученными.

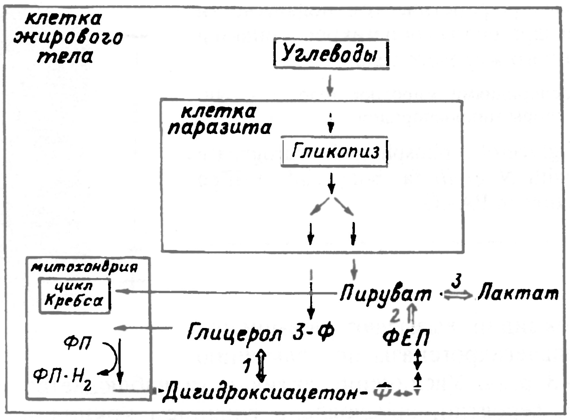

Рис. 2. Предположительная схема участия глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы клетки хозяина в утилизации конечных продуктов энергетического обмена микроспородий.

Двойные стрелки — реакции, катализуемые ферментами, для которых отмечено увеличение активности при заражении. *1* — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; *2* — пируваткиназа; *3* — лактатдегидрогеназа.

Fig. 2. Possible scheme of participation of glycerol 3-phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase in utilization of end products of the Microsporidia energy metabolism. Thick arrows show reactions, which are catalyzed by these enzymes.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, № 97-4-48383, 96-04-48985).

Список литературы

Бутаева Ф. Г. Жизненный цикл, цитологические и цитохимические особенности Adelina grylli Butaeva, 1996 (Apucomplexa, Eucoccidiida, Adeleidae): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1996. 15 с.

Долгих В. В., Григорьев М. В., Соколова Ю. Я., Исси И. В. Влияние заражения микроспоридией Nosema grylli и кокцидией Adelina sp. на активность и состав изоферментов лактатдегидрогеназы в жировом теле сверчков Gryllus bimaculatus // Паразитология. 1995. Т. 29, вып. 6. С. 520—524.

Долгих В. В., Григорьев М. В., Соколова Ю. Я., Исси И. В. Сравнительное изучение влияния микроспоридии Nosema grylli и кокцидии Adelina sp. на развитие яичников и активность трех дегидрогеназ в жировом теле самок сверчков Gryllus bimaculatus // Паразитология. 1996. Т. 30, вып. 1. С. 70—75.

Князев А. Н. Цикл развития сверчка Gryllus bimaculatus, 1985 Deg. (Orthoptera, Gryllidae) в условиях лабораторного содержания // Энтомол. обозр. 1985. Т. 64, вып. 1. С. 58—73.

Корочкин Л. И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 278 с.

Соколова Ю. Я., Селезнев К. В., Долгих В. В., Исси И. В. Микроспоридия Nosema grylli n. sp. из сверчков Gryllus bimaculatus // Паразитология. 1994. Т. 28, вып. 6. С. 488—493.

Хованских А. Е. Биохимия кокцидий и кокцидиозов. Л.: Наука, 1984. 192 с.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248—254.

Dolgikh V., Sokolova Y., Issi I. Activities of Enzymes of Carbohydrate and Energy Metabolism of the Spores of the Microsporidian, Nosema grylli // J. Euk. Microbiol. 1997. Vol. 44, N 3. P. 246—249.

Hazard E. I., Ellis E. A., Joslyn D. J. Identification of Microsporidia // Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970—1978. London; N. Y.; Toronto; Sydney; San Francisco: Academic Press, 1981. P. 163—182.

Selesnev K., Issi I., Dolgikh V., Belostotskaya G., Antonova O., Sokolova J. Fractionation of different life cycle stages of microsporidia Nosema grylli from crickets Gryllus bimaculatus by centrifugation in percoll density gradient for biochemical research // J. Euk. Microbiol. 1995. Vol. 42, N 3. P. 288—292.

Sherman I. W. Biochemistry of Plasmodium (malarial parasites) // Microbiol. Rev. 1979. Vol. 43. P. 453—495.

Всероссийский институт защиты растений
Санкт-Петербург—Пушкин—8, 189620

Поступила 10.01.1998

INFLUENCE OF MICROSPORIDIANS NOSEMA GRYLLI AND COCCIDIANS ADELINA GRYLLI ON THE ACTIVITIES OF FOUR ENZYMES OF CARBOHYDRATE AND ENERGY METABOLISM IN FAT BODY OF CRICKETS GRYLLUS BIMACULATUS

V. V. Dolgikh

Key words: *Gryllus bimaculatus*, coccidiosis microsporidiosis, enzymes.

SUMMARY

Activities of hexokinase (EC 2.7.1.1), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.8), pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) and alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) were measured in fat bodies of control, infected with *Nosema grylli* (Microsporidia) (*M*) and infected with *Adelina grylli* (Coccidia) (*C*) crickets *Gryllus bimaculatus*. Measuring did not show alterations of the hexokinase activities in fat body of crickets with both infections in comparison with the control. Two parasites caused an increase of glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity (in 6 times with *M* and in 4 times with *C*). Pyruvate kinase activities increased approximately in 10 times in fat body with *M* infection, but *C* did not cause alterations of activity of this enzyme. In contrast, the alcohol dehydrogenase activity increased in 2—3 times in fat body with *C* infection, but did not alter in the case of *M* infection. Data about influence of *M* and *C* on enzymes activities are discussed.